

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian dengan judul Produksi *Volatil Fatty Acids* (VFA), NH_3 dan Protein Total *Fodder* Jagung Hidroponik pada Umur Panen Berbeda Secara *In Vitro* telah dilaksanakan pada bulan 26 November – 15 Desember 2016, di *green house* Fakultas Peternakan dan Pertanian, serta analisis secara laboratoris dilaksanakan pada tanggal 21–28 Februari 2017, di laboratorium Ilmu Nutrisi dan Pakan Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang.

3.1. Materi

Bahan yang digunakan antara lain benih jagung sebanyak 600 gram/nampan sebagai bahan yang dikaji, larutan H_2SO_4 dengan molaritas 0,001 M sebanyak 0,6 ml dalam 10 l air untuk media perendaman (skarifikasi) benih jagung, larutan AB mix sebagai nutrisi untuk tanaman serta pupuk gandasil D (N (Nitrogen), P (P_2O_5), K (K_2O), Mn, Co, Cu dan Zn) untuk mempercepat pertumbuhan. Bahan yang dibutuhkan untuk uji VFA antara lain H_2SO_4 15%, NaOH 0,5 N, HCl 0,5 N dan indikator PP 1%. Bahan yang digunakan untuk uji NH_3 antara lain indikator *methyl red*, indikator *brom cressol green*, H_3BO_3 , H_2SO_4 0,0055 N dan Na_2CO_3 jenuh. Bahan yang digunakan untuk uji protein total antara lain campuran *trichloroacetic acids* (TCA) 20% dan *sulphosalicylic acid* (SSA) 2%, H_2SO_4 pekat, selenium, akuades, NaOH, H_3BO_3 , campuran indikator *methyl red* dan *methyl blue* dan HCl 0,1 N.

Alat yang digunakan antara lain nampan sebagai tempat media tumbuh *fodder* jagung, timbangan untuk mengukur berat biji jagung sebelum ditanam dan saat pemanenan, penyemprot air untuk menjaga kelembaban tanaman, alat tulis untuk mencatat hasil pengamatan, timbangan analitis, tabung fermentor, waterbath, sentrifuse, tabung suling VFA beserta alat destilasi, cawan conway, pipet ukur 1 ml, pipet ukur 5 ml, buret mikro 2 ml untuk titrasi NH_3 , buret 50 ml untuk titrasi VFA, beaker glass 250 ml, klem, statif, tabung erlenmeyer 250 ml, kompor, destilator, kertas saring, corong *buchner* dan labu destruksi.

3.2. Metode

3.2.1. Rancangan Penelitian

Penelitian mengenai produksi VFA, NH_3 dan protein total secara *in vitro* pada *fodder* jagung hidroponik dengan umur panen yang berbeda dilaksanakan dengan rancangan acak lengkap yang terdiri atas 5 perlakuan umur panen yang diulang sebanyak 4 kali. Perlakuan yang diterapkan adalah sebagai berikut:

T1 : Umur panen 9 hari
 T2 : Umur panen 12 hari
 T3 : Umur panen 15 hari
 T4 : Umur panen 18 hari
 T5 : Umur panen 21 hari

Variabel yang diukur meliputi produksi VFA, NH_3 dan protein total. Pengukuran produksi VFA dilakukan dengan teknik destilasi uap (General Laboratory Procedure, 1966). Pengukuran produksi NH_3 menggunakan metode mikrodifusi *conway* (General Laboratory Procedure, 1966). Pengukuran produksi protein total dilakukan menggunakan metode Kjeldal (AOAC, 2005).

3.2.2. Prosedur Penelitian

Penelitian dilakukan dengan beberapa tahap. Tahap pertama yaitu benih jagung direndam terlebih dahulu kedalam larutan H_2SO_4 dengan molaritas 0,001 M sebanyak 0,6 ml/10 l air selama 30 menit, setelah itu benih jagung ditiriskan dan direndam ke dalam air selama 24 jam. Benih jagung sebanyak 600 gram/nampan ditempatkan ke dalam media tumbuh, kemudian dilakukan penyemprotan larutan nutrisi AB mix setiap 2 jam sekali serta pemupukan pada hari ke 3 dan 13. *Fodder* jagung hidroponik dipanen pada hari ke 9 (T1), hari ke 12 (T2), hari ke 15 (T3), hari ke 18 (T4) dan hari ke 21 (T5). *Fodder* jagung hidroponik dikeringkan dan dihaluskan terlebih dahulu sebelum digunakan untuk analisis.

Tahap kedua yaitu dilakukan uji fermentabilitas pada sampel secara *in vitro*. Supernatan dibuat dengan cara sampel ditimbang sebanyak 0,55–0,56 g, kemudian dimasukkan ke dalam tabung fermentor. Tabung fermentor yang telah diisi sampel, larutan McDougall dan cairan rumen kemudian dialiri dengan CO_2 dan ditutup rapat sehingga tercipta suasana *anaerob*, setelah itu tabung fermentor diaduk sehingga menjadi homogen. Waterbath diisi air secukupnya dan disiapkan dengan temperatur 38–39°C, kemudian dilakukan inkubasi selama 3 jam. Tabung fermentor diangkat dari waterbath setelah inkubasi selesai dan dimasukkan dalam air dingin agar proses fermentasi berhenti. Larutan fermentasi tersebut kemudian disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm sehingga menghasilkan cairan dan endapan. Cairan yang telah dipisahkan dengan endapan disebut supernatan yang digunakan untuk uji fermentabilitas.

Prosedur Analisis VFA

Analisis VFA dilakukan dengan teknik destilasi uap (General Laboratory Procedure, 1966). Supernatan dimasukkan ke dalam tabung suling VFA sebanyak 5 ml dan ditambahkan 1 ml H_2SO_4 15%. Tabung suling dimasukkan ke dalam labu suling berisi akuades sebanyak 700 ml yang telah dihubungkan dengan pendingin Leibig, kemudian tabung segera ditutup. Destilat ditampung kedalam erlenmeyer 250 ml yang berisi larutan NaOH sebanyak 5 ml, setelah itu destilasi dihentikan apabila volume telah mencapai 100 ml. Destilat yang berada di erlenmeyer kemudian ditambahkan dengan indikator PP 1% sebanyak 2 tetes. Titrasi dilakukan menggunakan larutan HCl 0,5 N hingga terjadi perubahan warna dari merah muda menjadi bening. Blanko dibuat dengan cara sama seperti prosedur pengukuran VFA namun tidak menggunakan supernatan dari sampel percobaan. Konsentrasi VFA dihitung menggunakan rumus:

$$\text{VFA (mM)} = (\text{volume titran blanko} - \text{volume titran sampel}) \times \text{N-HCl} \times 1000/5$$

Keterangan :

N-HCl = Normalitas larutan HCl

Titran blanko = Jumlah titer HCl untuk menitrasi 5 ml NaOH (blanko)

Titran sampel = Jumlah titer HCl untuk menitrasi hasil destilasi

Prosedur Analisis NH_3

Pengukuran konsentrasi NH_3 menggunakan metode Mikrodifusi *Conway* (General Laboratory Procedure, 1966). Cawan *Conway* disiapkan dan kemudian bagian tepinya diolesi dengan menggunakan vaselin. Asam borat (H_3BO_3) sebanyak 1 ml dimasukkan kedalam cawan *conway*, setelah itu ditambahi

indikator campuran *methyl red* dan *brom cressol green* sebanyak 1 tetes. Supernatan diambil sebanyak 1 ml dan diteteskan pada salah satu ujung cawan Conway, kemudian 1 ml larutan Na_2CO_3 diambil dan ditempatkan pada sisi yang berlawanan dengan supernatan (kedua bahan tidak boleh bercampur sebelum tutup cawan ditutup rapat). Cawan ditutup hingga rapat dan digoyangkan sehingga supernatan dan larutan Na_2CO_3 tercampur dengan merata. Cawan didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang, setelah itu dilakukan titrasi menggunakan larutan H_2SO_4 0,0055 N hingga terjadi perubahan warna dari biru menjadi kemerahan. Produksi NH_3 dihitung menggunakan rumus:

$$\text{NH}_3 \text{ (mM)} = \text{volume titran } \text{H}_2\text{SO}_4 \times \text{N-}\text{H}_2\text{SO}_4 \times 1000$$

Keterangan :

Volume titran H_2SO_4 = Jumlah ml H_2SO_4 yang dititrasi

N- H_2SO_4 = Normalitas larutan H_2SO_4

Prosedur Analisis Protein Total

Analisis protein total yang dilakukan menggunakan metode Kjeldahl (AOAC, 2005). Hasil fermentasi sampel yang digunakan secara *in vitro* sebelum disentrifuge diambil terlebih dahulu sebanyak 10 ml untuk analisis protein total. Sampel tersebut ditambahkan 20 ml campuran TCA 20% dan SSA 2%, kemudian sampel didiamkan selama ± 6 jam hingga sampel mengendap. Sampel yang telah mengendap disaring menggunakan kertas saring Whatmann 41, setelah itu dioven pada suhu 105°C selama 6 jam hingga berat konstan dan ditimbang. Endapan sampel tersebut kemudian dianalisis menggunakan metode Kjeldahl. Destruksi dilakukan dengan memasukkan sampel ke dalam tabung destruksi, kemudian

ditambahkan 10 ml H_2SO_4 pekat serta katalis selenium 1 g dalam lemari asam selama ± 1 jam hingga larutan berwarna hijau bening. Setelah itu, kemudian dilakukan destilasi dengan menambahkan 50 ml akuades dan 40 ml NaOH 45% dan tabung segera ditutup. Destilat ditampung dalam tabung erlenmeyer yang berisi 15 ml H_3BO_3 4% dan 2 tetes indikator campuran metil merah dan metil biru hingga volumenya mencapai 100 ml. Hasil destilasi kemudian di titrasi dengan menggunakan HCl 0,1 N hingga terbentuk warna ungu kembali. Blanko dibuat dengan cara sama seperti prosedur produksi protein total namun tidak menggunakan sampel. Produksi protein total dihitung menggunakan rumus :

Produksi Protein Total (mg/g) =

$$\frac{(\text{Volume titran sampel} - \text{Volume titran blanko}) \times \text{N-HCl} \times 14 \times 6,25}{\text{Berat sampel endapan (g)}}$$

Keterangan :

Titran sampel = Volume HCl yang dibutuhkan untuk titrasi hasil destilasi (ml)

Titran blanko = Volume HCl yang dibutuhkan untuk titrasi blanko (ml)

N-HCl = Normalitas HCl yang digunakan untuk titrasi

14 = 1 ml larutan alkali ekuivalen dengan 1 ml larutan yang mengandung 14 mg N

6,25 = faktor kelipatan N yang diperoleh dari 100/16

3.3. Analisis Data

Model linear aditif yang menjelaskan setiap nilai pengamatan berdasarkan rancangan acak lengkap (RAL) adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad ; \quad \begin{array}{l} i = \text{perlakuan (1,2,3,4,5)} \\ j = \text{ulangan (1,2,3,4)} \end{array}$$

Keterangan :

Y_{ij} = Produksi VFA, NH_3 dan protein total *fodder* jagung hidroponik ke-j yang memperoleh perlakuan umur panen ke-i.

μ = Nilai tengah umum (rata – rata populasi) produksi VFA, NH_3 dan protein total *fodder* jagung hidroponik.

τ_i = Pengaruh aditif dari perlakuan umur panen ke-i.

ε_{ij} = Pengaruh galat percobaan pada kadar produksi VFA, NH_3 dan protein total *fodder* jagung hidroponik ke-j yang memperoleh perlakuan umur panen ke-i.

Data yang diperoleh kemudian diolah secara statistik dengan analisis ragam, apabila menunjukkan pengaruh nyata ($p < 0,05$) maka dilanjutkan dengan *Duncan multiple range test* (DMRT) untuk melihat beda antar nilai tengah perlakuan (Steel dan Torie, 1990).

Hipotesis Statistik

$H_0 : \tau_1 = \tau_2 = \dots = 0$; Tidak ada pengaruh umur panen yang berbeda terhadap produksi VFA, NH_3 dan protein total secara *in vitro* pada *fodder* jagung hidroponik.

H_1 : Minimal ada satu $\tau_i \neq 0$; minimal ada satu perlakuan umur panen yang berbeda yang mempengaruhi produksi VFA, NH_3 dan protein total secara *in vitro* pada *fodder* jagung hidroponik.

Kriteria Pengujian

Jika $F_{\text{hitung}} \leq F_{\text{tabel}} (5\%)$ maka H_0 diterima dan H_1 ditolak

Jika $F_{\text{hitung}} \geq F_{\text{tabel}} (5\%)$ maka H_0 ditolak dan H_1 diterima.